



B  
Ch

THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of :

Thomas Hunig

Serial No. : 09/449,077 ✓

Filed : November 24, 1999

For : HUMAN CD28 SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODIES

**SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT(S)**

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Submitted herewith is a certified copy of each of the below-identified document(s),  
benefit of priority of each of which is claimed under 35 U.S.C. § 119:

COUNTRY	APPLICATION NO.	FILING DATE
Germany	197 22 888.7	May 28, 1997

Acknowledgment of the receipt of the above document(s) is requested.

No fee is believed to be due in association with this filing, however, the Commissioner is hereby authorized to charge fees under 37 C.F.R. §§ 1.16 and 1.17 which may be required to facilitate this filing, or credit any overpayment to Deposit Account No. 13-3402.

Respectfully submitted,

Richard M. Lebovitz, Reg. No. 37,067  
Attorney for Applicants

MILLEN, WHITE, ZELANO  
& BRANIGAN, P.C.  
Arlington Courthouse Plaza I  
2200 Clarendon Blvd. Suite 1400  
Arlington, Virginia 22201  
Telephone: (703) 243-6333  
Facsimile: (703) 243-6410

Attorney Docket No.: ALBRE-0020

Date: December 3, 2004

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

BEST AVAILABLE COPY

**Aktenzeichen:** 197 22 888.7

**Anmeldetag:** 28. Mai 1997

**Anmelder/Inhaber:** TeGenero GmbH, 97078 Würzburg/DE  
Erstanmelder: Professor Dr. Thomas H ü n i g,  
97078 Würzburg/DE

**Bezeichnung:** Human-CD28 spezifische monoklonale Antikörper  
zur antigenunspezifischen Aktivierung von  
T-Lymphozyten

**IPC:** C 07 K, A 61 K, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 4. November 2004  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag Schäfer



### Zusammenfassung

Die Erfindung lehrt humanverträgliche monoklonale Antikörper, welche gegen Human-CD28 spezifisch sind und Human-T-Lymphozyten mehrerer bis aller Untergruppen ohne Besetzung eines Antigenrezeptors der Human-T-Lymphozyten und somit antigenunspezifisch aktivieren.

10

15

20

25

30

6

# Dres. Fitzner & Christophersen

Rechts- und Patentanwälte  
Ratingen - Berlin

Belegexemplar  
Dart nicht geändert werden

## Patentanmeldung

### Ratingen:

Dr. iur. Ulrich Fitzner  
Rechtsanwalt

Dr.-Ing. Dr. iur. Uwe Fitzner  
Rechts- und Patentanwalt / European Trademark Attorney

Dipl.-Chem. Dr. Ruth Christophersen  
Patentanwältin / European Patent Attorney /  
European Trademark Attorney

### Berlin:

Dipl.-Chem. Dr. Bernhard Jungblut  
Patentanwalt / European Patent Attorney /  
European Trademark Attorney

Anwaltsakte: UNW/DE/972

Datum: 24.05.1997

Anmelder: Prof. Dr. Thomas Hünig, Mittlere Heerbergstr. 26,  
D-97078 Würzburg

Titel: Human-CD28 spezifische monoklonale Antikörper zur anti-  
genunspezifischen Aktivierung von T-Lymphozyten

Priorität: -----

Beschreibung:

Die Erfindung betrifft monoklonale Antikörper, welche für  
5 Human-CD28 spezifisch sind und T-Lymphozyten ohne  
Besetzung eines Antigenrezeptors der T-Lymphozyten und  
somit antigenunspezifisch aktivieren, Hybridomzellen zur  
Herstellung solcher Antikörper, ein Verfahren zur  
Herstellung solcher Antikörper sowie Verwendungen solcher  
10 Antikörper. - Als monoklonale Antikörper sind Antikörper  
bezeichnet, die von Hybrid-Zelllinien (sog. Hybridomen)  
produziert werden, die durch Fusion einer Antikörper  
produzierenden B-Zelle tierischer oder menschlicher  
Herkunft mit einer geeigneten Myelom Tumorzelle entstanden  
15 sind. Als CD28 wird ein auf T-Lymphozyten menschlicher und  
tierischer Herkunft exprimiertes Zelloberflächenmolekül  
bekannter Aminosäuresequenz bezeichnet, dem im Rahmen der  
internationalen "Human Leukocyte Typing Workshops" das  
Kürzel CD28 gegeben wurde. Mit Aktivierung von  
20 T-Lymphozyten ist die Vermehrung der Stoffwechselak-  
tivität, Vergrößerung des Zellvolumens, Synthese  
immunologisch wichtiger Moleküle und Eintritt in die  
Zellteilung (Proliferation) von T-Lymphozyten auf einen  
äußeren Reiz hin gemeint. Beispielsweise werden diese  
25 Vorgänge durch Besetzung des CD28-Moleküls auf T-Zellen  
durch besondere CD28-spezifische monoklonale Antikörper  
ausgelöst. Die Aktivierung von T-Lymphozyten mit den  
beschriebenen Begleiterscheinungen ist Teil der  
physiologischen Immunreaktion, kann dort aber in  
30 pathologischen Situationen außer Kontrolle geraten  
(lymphoproliferative Erkrankungen), oder unzureichend sein  
(Immundefizienz).

Zum Verständnis der Erfindung ist zunächst folgender technologischer Hintergrund wichtig. Die Aktivierung ruhender T-Zellen zur Proliferation und funktionellen Differenzierung erfordert zunächst die Besetzung zweier Oberflächenstrukturen, sogenannter Rezeptoren: 1. des Antigenrezeptors, der von Zelle zu Zelle eine unterschiedliche Spezifität besitzt und für die Erkennung von Antigenen, z. B. viralen Spaltprodukten, notwendig ist; sowie des auf allen ruhenden T-Zellen gleichermaßen exprimierten CD28 Moleküls, welches natürlicherweise an Liganden auf der Oberfläche anderer Zellen des Immunsystems bindet. Man spricht von der "Kostimulation" der antigenspezifischen Immunreaktion durch CD28. In Zellkultur können diese Vorgänge nachgestellt werden durch Besetzung des Antigenrezeptors sowie des CD28-Moleküls mit geeigneten monoklonalen Antikörpern. Im klassischen System der Kostimulation führt weder die Besetzung des Antigenrezeptors noch die des CD28-Moleküls allein zur T-Zellproliferation, die Besetzung beider Rezeptoren ist jedoch effektiv. Diese Beobachtung wurde an T-Zellen des Menschen, der Maus und der Ratte gemacht.

Monoklonale Antikörper der eingangs genannten Art sind bekannt. Eine "direkte", d. h. von der Besetzung des Antigenrezeptors unabhängige Aktivierung ruhender T-Lymphozyten durch CD28-spezifische monoklonale Antikörper, wurde in folgenden Systemen beobachtet: in der Literaturstelle Brinkmann et al., J. Immunology, 1996, 156: 4100-4106 wurde gezeigt, dass ein sehr kleiner Anteil (5 %) menschlicher T-Lymphozyten, die den für ruhende T-Lymphozyten typischen Oberflächenmarker CD45 RO tragen, durch den "klassischen" CD28-spezifischen monoklonalen Antikörper 9.3 bei Zusatz des Wachstumsfaktors



Interleukin-2 (IL-2) ohne Besetzung des Antigenrezeptors aktiviert wird. In der Arbeit von Siefken et al., Cellular Immunology, 1997, 176: 59-65, wurde gezeigt, dass ein auf konventionellem Wege, d.h. durch Immunisierung von Mäusen mit menschlichen T-Zellen, hergestellter CD28-spezifischer monoklonaler Antikörper in Zellkultur eine Untergruppe menschlicher T-Zellen ohne Besetzung des Antigenrezeptors zur Proliferation aktivieren kann, wenn CD28 durch diesen monoklonalen Antikörper besetzt wird und die zellgebundenen monoklonale Antikörpermoleküle zusätzlich durch weitere Antikörper miteinander vernetzt werden. In beiden Fällen sind die beschriebenen Antikörper zunächst grundsätzlich nicht zum Einsatz in der Humanmedizin geeignet, da es sich um Maus Antikörper handelt. Weiterhin ist beiden beschriebenen Antikörpern gemeinsam, daß nur ein sehr kleiner Anteil der T-Zellen "direkt" aktivierbar ist.

In der Arbeit von Tacke et al., Eur. J. Immunol., 1997, 27:239-247 wurden zwei Arten von CD28-spezifischen monoklonalen Antikörpern mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften beschrieben: "klassische Antikörper", die die Aktivierung ruhender T-Zellen nur bei gleichzeitiger Besetzung des Antigenrezeptors kostimulieren; und "direkte", die ohne Besetzung des Antigenrezeptors T-Lymphozyten aller Klassen in vitro und im Versuchstier zur Proliferation aktivieren können. Beide insofern bekannte monoklonale Antikörper rühren aus einer Immunisierung mit Zellen, auf denen Ratten-CD28 exprimiert ist und sind durch auf ihre jeweiligen beschriebenen Eigenschaften gerichtete unterschiedlichen Selektionen erhältlich. Ferner wird in dieser Literaturstelle gezeigt, daß CD28-spezifische monoklonale Antikörper, die den direkt aktivierenden Effekt besitzen, viel langsamer als



klassische CD28-spezifische monoklonale Antikörper an T-Lymphozyten binden; die Bindung an eine Mausfibroblasten-Zelllinie (L-929), an deren Oberfläche das CD28-Molekül künstlich durch Transfektion exprimiert wird, erfolgt jedoch für klassische und "direkt" stimulierende CD28-spezifische monoklonale Antikörper mit der gleichen Geschwindigkeit. Daraus wird gefolgert, daß die insofern bekannten "direkt" stimulierenden CD28-spezifischen monoklonalen Antikörper eine aktive Form des CD28-Moleküls erkennen, deren Vorliegen auf ruhenden T-Zellen durch einen bisher unbekannten Mechanismus unterdrückt wird, die aber bei Expression des Moleküls in nicht-T Tumorzelllinien zugänglich ist. Die insofern bekannten monoklonalen Antikörper sind jedoch einerseits gegen Ratten-CD28 spezifisch und andererseits Maus-Antikörper. Sie eignen sich daher aus beiden Gründen nicht für therapeutische Zwecke beim Menschen.

Gegenüber dem Stand der Technik gemäß der beiden erstgenannten Literaturstellen liegt der Erfindung das technische Problem zugrunde, "direkte" Human-CD28 spezifische monoklonale Antikörper zur Verfügung zu stellen, die zum einen auch humanverträglich sind und die zum anderen Human T-Zellen in breitem Umfang zu aktivieren vermögen.

Zur Lösung dieses technischen Problems lehrt die Erfindung humanverträgliche monoklonale Antikörper, welche für Human-CD28 spezifisch sind und Human-T-Lymphozyten mehrerer bis aller Untergruppen ohne Besetzung eines Antigenrezeptors der Human-T-Lymphozyten und somit antigenunspecific aktivieren, vorzugsweise mit humanen konstanten Komponenten. - Konstante Komponenten eines Antikörpers

sind Bereiche, die nicht für die Antigenerkennung bedeut-  
sam sind, im Gegensatz zu den variablen Bereichen, die die  
Antigenspezifität eines Antikörpers definieren. Konstante  
Komponenten unterscheiden sich jedoch bei Antikörpern ver-  
5 schiedener Arten und folglich auch Tieren und Menschen.  
Die konstanten Bereiche eines Antikörpers müssen jenen von  
Antikörpern eines Organismus entsprechen, der mit den An-  
tikörpern behandelt werden soll, um verträglich zu sein.  
Erfindungsgemäße monoklonale Antikörper sind daher einer-  
10 seits humanverträglich, sei es per se oder durch Humani-  
sierung und können andererseits zur Behandlung verschied-  
ener Krankheiten, die auf zu geringer T-Lymphozyten-  
Aktivität beruhen, dienen, da die Antikörper gegen  
Human-CD28 spezifisch sind und da die Aktivierung der T-  
15 Lymphozyten umfassend ist.

Unter die Erfindung fallen selbstverständlich verschieden-  
ste Derivate von monoklonalen Antikörpern, sofern die  
beanspruchten Merkmale erfüllt sind. Unter Derivaten von  
20 monoklonalen Antikörpern sind Modifikationen des monoklon-  
alen Antikörpers zu verstehen, die durch übliche bio-  
chemische oder gentechnische Manipulationen erzeugt  
wurden. Dies ist beispielsweise gegeben mit der Humani-  
sierung eines monoklonale Antikörpers der Maus durch par-  
25 tiellen Ersatz struktureller (konstanter) Komponenten des  
Maus-Antikörpers durch solche eines menschlichen.

Im einzelnen sind erfindungsgemäße monoklonale Antikörper  
erhältlich durch: A) Herstellung von zur Produktion von  
30 monoklonalen Human-CD28 spezifischen Tier-Antikörpern  
befähigten Hybridomzellen im Wege einer Immunisierung mit  
nicht-T-Tumorzelllinien, auf welchen Human-CD28 exprimiert  
ist, B) ggf. Humanisierung der aus Hybridomzellen gemäß

Stufe A erhältlichen monoklonalen Tier-Antikörper durch biochemischen oder gentechnologischen Austausch konstanter Komponenten der Tierantikörper gegen analoge konstante Komponenten eines menschlichen Antikörpers bzw. Austausch  
5 den Komponenten entsprechender Gene der Hybridomzellen, C) Sezernierung der Antikörper in Hybridomzell-Kulturen und Isolierung der Antikörper daraus oder Produktion der Antikörper durch Injektion der Hybridomzellen in Tiere, beispielsweise Mäuse, und Isolierung der Antikörper aus  
10 der Körperflüssigkeit der Tiere. - Der Kern der Erfindung besteht gegenüber den nächstliegenden Literaturstellen Brinkmann et al., J. Immunology, 1996, 156: 4100-4106, und Siefken et al., Cellular Immunology, 1997, 176: 59-65,  
15 demnach in der Erkenntnis, daß eine "direkte" Aktivierung praktisch aller T-Lymphozyten dann erreichbar ist, wenn die monoklonalen Antikörper durch Immunisierung mit nicht-T Tumorzellen, auf welchen Human-CD28 exprimiert ist, erhalten sind, anstelle einer Immunisierung mit T-Zelllinien. Denn so können monoklonale Antikörper erhalten  
20 werden, die nicht nur gegen Human-CD28 spezifisch sind, sondern auch eine "direkte" Aktivierung in beachtlichem Umfang bewirken. Im einzelnen weisen erfindungsgemäße monoklonale Antikörper Spezifität für Determinanten des menschlichen CD28-Moleküls auf, die auf dem natürlicher-  
25 weise exprimierten CD28-Molekül schwer zugänglich sind und deren Besetzung durch die neuartigen monoklonale Antikörper zur Aktivierung der T-Zellen führt. Unter einer Determinante ist der Bereich eines Moleküls zu verstehen, der durch die Bindungsspezifität eines oder mehrerer Antikörper  
30 per definiert wird.



Die grundsätzliche Vorgehensweise bei der Herstellung von Hybridomzellen, bei der Humanisierung sowie bei der

Produktion der monoklonalen Antikörper aus (humanisierten) Hybridomzellen ist dem Fachmann gut vertraut und braucht hier nicht näher erläutert zu werden. Grundsätzlich sind alle insbesondere für die Herstellung der Hybridomzellen üblichen, bekannten und frei verfügbaren Zelllinien einsetzbar. Zur Herstellung der monoklonalen Antikörper kommt grundsätzlich neben der folgend beschriebenen Vorgehensweise die dem Fachmann im Detail gut geläufige rekombinante Expression in Frage.

10

Im einzelnen ist es bevorzugt, wenn die zur Produktion von monoklonalen Human-CD28 spezifischen Tier-Antikörper befähigten Hybridomzellen erhältlich sind durch a) Schaffung eines Plasmids mittels Insertion von Human-CD28 cDNA in den pH8APr-1-neo Vector nach Excision des SalI-HindIII Fragments und Herstellung von Protoplasten aus Escherichia coli (MC1061), welche das Plasmid tragen, b) Fusionierung der Protoplasten mit Maus A20J und/oder L929 Tumorzellen mittels Polyethylenglykol, c) Kultivierung der in Stufe b erhaltenen transfektierten Zellen, d) Screenen der transfektierten Maus A20J und/oder L929 Zellen auf die Expression von Human CD28 und Selektion von Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen, e) Immunisierung von BALB/c Mäusen mit den Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen (beispielsweise durch Injektionen 6 x i.p. und anschließend 1 x i.v.), f) Entnahme von Milzzellen der so immunisierten Mäuse und Fusionierung der Milzzellen mit ("nonproducer"-, d.h. keine Antikörper produzierenden) Zellen der Zelllinie X63-Ag 8.653 mittels Polyethylenglykol, g) Selektierung der so erhaltenen Hybridomzellen mit der Maßgabe, daß im Überstand selektierter Hybridomzellen Antikörper enthalten sind, die an Human CD28 exprimierende Maus A20J und/oder L929 Zellen

binden und h) Kultivierung/Subclonierung der in Stufe g erhaltenen selektierten Hybridomzellen. Anstelle der Stufen a) bis d) können selbstverständlich aber auch andere dem Fachmann geläufige Expressionssysteme eingesetzt werden. Human-CD28 cDNA ist frei erhältlich von Dr. A Aruffo und Dr. B. Seed, die die Sequenz und auch folgende Literaturstelle veröffentlicht haben: Aruffo, A., and Seed, B, 1987, "Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high efficiency COS cell expression system", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:8573. Dieser Literaturstelle ist daher im einzelnen die Herstellung der Human-CD28 cDNA entnehmbar. Darüberhinaus kann unschwer jeder Fachmann mit Hilfe der in der Genbank deponierten Sequenz und der Polymerasekettenreaktion sehr einfach und schnell einen Human-CD28 cDNA Klon herstellen. Der pHBApr-1-neo Vector ist frei erhältlich von den Autoren der Literaturstelle Gunning, P, et al., 1987, "A human  $\beta$ -actin expression vector system directs high-level accumulation of antisense transcripts", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:4831. "neo" steht dabei für Neomycin-Resistenz. Die Stufe c) wird daher in Anwesenheit von Neomycin durchgeführt. Die vorstehend angesprochenen Zelllinien und/oder Mikroorganismen sind frei verfügbar und käuflich erwerbbar bei der American Type Culture Collection (ATCC). Bezüglich Escherichia coli (MC1061) wird ergänzend auf die Literaturstelle Meissner, P.S., et al., 1987, "Bacteriophage gamma cloning system for the construction of directional cDNA libraries", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:4171, verwiesen.

30 Gegenstand der Erfindung sind demnach auch gemäß Patentanspruch 4 Hybridomzellen sowie ein Verfahren zur Herstellung von erfindungsgemäßen Antikörpern gemäß der Patentansprüche 5 und 6.



Von eigenständiger Bedeutung ist aber im Rahmen der Erfindung die Verwendung von erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörpern zur Herstellung von Arzneimitteln, insbesondere zur Behandlung von Erkrankungen mit pathologisch erniedrigten CD4-T-Zellzahlen, wie AIDS oder bei Stammzelltransplantation nach Chemotherapie von leukämischen Erkrankungen, zur Potenzierung und/oder qualitativen Beeinflussung von Immunreaktionen bei Schutzimpfungen und/oder zur Beeinflussung der Qualität der T-Zellreaktion, insbesondere zur Beeinflussung der Produktion verschiedener Effektormoleküle, beispielsweise Zytokine, bei beispielsweise Autoimmunerkrankungen. Die galenische Herrichtung der Arzneimittel für die verschiedenen Verabreichungsformen ist dem Fachmann gut bekannt und braucht hier nicht näher erläutert zu werden. Als Qualität der T-Zellreaktion ist insbesondere die Produktion bestimmter Zytokinmuster zu verstehen, die z.B. pro- oder anti-inflammatorisch wirksam sein können oder selektiv zur Produktion bestimmter Immunglobulinklassen in B-Lymphozyten führen können (klassische Beispiele für verschiedene Qualitäten der T-Zellreaktion sind die funktionellen TH1 und TH2 Phänotypen, wie in Beispiel 3 beschrieben).

25

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert. In diesen Ausführungsbeispielen werden insbesondere Screeningverfahren im einzelnen präsentiert, mit welchen erfindungsgemäße monoklonale Antikörper bzw. zugrundeliegende Hybridomzellen selektiert werden können. Die Screeningverfahren werden dabei aus Gründen der Einfachheit und zur Demonstration der Verifizierbarkeit an Tiermodellen beschrieben, weshalb mit an

30

sich bekannten monoklonalen Antikörpern (JJ 316), welche aus einer Immunisierung mit Ratten-CD28 exprimierenden Zellen herrühren, gearbeitet wird, die aufgrund der Tiermodelle im Gegensatz zu erfindungsgemäßen Antikörpern

5 Maus-anti-Ratte Antikörper sind und folglich spezifisch gegen Ratten-CD28 sind. Entsprechende Screeningverfahren lassen sich jedoch für erfindungsgemäße monoklonale Antikörper ohne weiteres durch Austausch der Ratten-CD28 exprimierenden Immunisierungszellen gegen Human-CD28

10 primierende nicht-T-Zellen und ggf. durch Humanisierung auf übliche Weise und auf ganz analogem Wege durchführen. Aus den folgenden Beispielen werden auch erfindungsgemäße therapeutische Einsatzmöglichkeiten deutlich.

15 Die dargestellten Experimente wurden im Tiermodell der Ratte durchgeführt, wobei als Beispiel für einen "klassischen" CD28-spezifischen Antikörper der monoklonale Antikörper JJ319 und als Beispiel für einen "direkt"

~~aktivierenden der monoklonale Antikörper JJ316 eingesetzt~~

20 wird. Beide Antikörper sind frei verfügbar und käuflich erwerbbar von der Firma Pharmingen, San Diego, USA. JJ319 und JJ316 Antikörper sind im übrigen erhältlich gemäß der Literaturstelle M. Tacke et al., Immunology, 1995, 154: 5121-5127, auf welche hiermit ausdrücklich Bezug genommen

25 wird, auch im Hinblick auf übliche Details der Herstellung von Hybridomzellen und monoklonalen Antikörpern.



#### Beispiel 1.

30

Fig. 1 zeigt die proliferative Antwort ungetrennter Lymphknotenzellen der Ratte auf den "direkt" stimulierenden CD28-spezifischen monoklonalen Antikörper

(JJ316) und das Ausbleiben einer solchen Antwort bei Einsatz eines "klassischen" CD28-spezifischen monoklonalen Antikörpers (JJ319). Die Zellen wurden zwei Tage lang in 0,2 ml Medium (RPMI 1640, erhältlich von GIBCO/BRL, enthaltend 5 % FCS [fetal calf serum]) in An- oder Abwesenheit der angegebenen Zusätze bei einer Dichte von 1 Mio. Zellen pro ml im begasteten Brutschrank kultiviert. Die Zellteilungsaktivität wurde durch den Einbau radioaktiv markierten Thymidins (1  $\mu$ Ci/Ansatz für 10 16 Std., 1Ci = 37GBq, Bestimmung mit  $\beta$ -Detektor) bestimmt.

Im Gegensatz zu veröffentlichten Resultaten (Siefken et al., Cellular Immunology, 1997, 176: 59-65) zeigt dieses Ergebnis, dass es für die T-Zell-Aktivierung durch direkt 15 aktivierende CD28-spezifische monoklonale Antikörper nicht notwendig ist, diese artifiziell durch einen zweiten Antikörper miteinander zu vernetzen. Vielmehr reicht die Anwesenheit von nicht-T-Zellen aus lymphoiden Organen, nämlich von B-Lymphozyten und sogenannten akzessorischen 20 Zellen, um eine direkte Aktivierung durch löslich zugegebene CD28-spezifische monoklonale Antikörper zu ermöglichen. Wahrscheinlich geschieht dies durch Bindung der monoklonale Antikörper an sogenannte Fc-Rezeptoren dieser nicht-T-Zellen. Dieses Ergebnis ist eine wichtige 25 Voraussetzung für den therapeutischen Einsatz "direkt" stimulierender CD28-spezifischer monoklonale Antikörper, in dem eine artifizielle Vernetzung mit anti-Immunglobulin Antikörpern im Gesamtorganismus nicht praktikabel ist.



## Beispiel 2.

"Direkt" aktivierende CD28-spezifische monoklonale Antikörper führen zu einer Erhöhung der CD4 T-Zellzahl im intakten Organismus. Fig. 2 zeigt dies für Lymphknoten der Ratte, die am Tag 0 1 mg des "direkt" stimulierenden CD28-spezifischen monoklonale Antikörpers (JJ316) oder des "klassischen" CD28-spezifischen monoklonalen Antikörpers (JJ319) erhalten hatten. Mit erfindungsgemäßen direkt aktivierenden monoklonalen Antikörpern mit Spezifität für Human-CD28, und deren Fähigkeit, die Vermehrung von T-Lymphozyten zu stimulieren, werden ganz analoge Effekte erreicht. Dies kann dann insbesondere in Situationen Anwendung finden, in denen der Anteil von CD4 T-Zellen pathologisch erniedrigt ist und dem Normalniveau wieder angenähert werden soll. Solche Situationen sind insbesondere im Krankheitsbild von AIDS und nach Chemotherapie und Knochenmarkstransplantation gegeben. Im vorliegenden Beispiel ist die CD4 T-Zellzahl nur vorübergehend erhöht; das liegt daran, daß gesunde Tiere mit normalen CD4 T-Zellzahlen behandelt wurden. Die aufgrund der Proliferationsstimulierung "überschüssigen" Zellen werden durch homöostatische Mechanismen abgebaut.

25

## Beispiel 3.

Direkt aktivierende CD28-spezifische monoklonale Antikörper sind therapeutisch einsetzbar, z. B. zur Verhinderung einer inflammatorischen Autoimmunreaktion. Fig. 3 zeigt ein Experiment zur sogenannten Adjuvans Arthritis in der Ratte, einem Modellsystem für bestimmte Formen der rheumatoiden Arthritis beim Menschen. "Paw

volume increase" gibt die Zunahme des Volumens der Pfoten an. "Days" steht für Tage. "Healthy"-Datenpunkte geben Werte für gesunde Tiere an. Zur Isotyp-Kontrolle wurde ein monoklonaler Antikörper der gleichen Immunglobulinklasse mit Spezifität für ein irrelevantes menschliches Zelloberflächenmolekül verwendet. AA steht für Adjuvans Arthritis. PBS steht für "phosphate buffered saline". W3/25 steht für einen monoklonalen Antikörper mit Spezifität für das CD4 Molekül der Ratte. Die Adjuvans Arthritis wird durch sogenannte TH1-Zellen vermittelt. TH1-Zellen entstehen aus ruhenden CD4 T-Zellen im Verlauf der Aktivierung unter dem Einfluß bestimmter löslicher Faktoren des Immunsystems, sogenannter Zytokine. Die Gegenspieler der TH1-Zellen sind die anti-inflammatorisch wirkenden TH2-Zellen, deren Entstehung durch andere Zytokine gesteuert wird. Bei dem in Fig. 3 und 4 gezeigten Versuch wurde die Entstehung der Adjuvans Arthritis, abgelesen an der Gelenkschwellung (Fig. 3) und dem arthritischen Index (Fig. 4) nach Immunisierung mit Mykobakterien in Adjuvans, durch den "direkt" aktivierenden CD28-spezifischen monoklonale Antikörper JJ316 fast vollständig unterdrückt. Der "klassische" CD28-spezifische monoklonale Antikörper (JJ319) hatte den gegenteiligen Effekt, d. h. er verschlechterte das Krankheitsbild. Daraus ist erkennbar, auch zur Anwendung beim Menschen, daß durch die Applikation konventioneller bzw. erfindungsgemäßer "direkt" stimulierender CD28-spezifischer monoklonaler Antikörper die Immunreaktion beeinflusst werden kann, hier im Sinne einer "Immundeviation" zu TH1 bzw. TH2. Mit anderen Worten ausgedrückt, können erfindungsgemäße monoklonale Antikörper, aber auch "klassische" monoklonale Antikörper, die für Human-CD28 spezifisch sind (und/oder durch

Immunisierung mit T-Zellen erhältlich sind) eine Immunmodulation bewirken. Ein solcher Einsatzzweck "klassischer" monoklonaler Antikörper ist ebenfalls nicht bekannt.

5

Daher betrifft die Erfindung schließlich auch die Verwendung von gegen Human-CD28 spezifischen monoklonalen Antikörpern (erhältlich nach vorstehenden grundsätzlichen Verfahrensweisen, bei Immunisierung mit Human-CD28 exprimierenden T-Zelllinien oder nicht-T-Zelllinien) zur Herstellung von Arzneimitteln zur Modulation von Immunreaktionen, und zwar Immunsuppression (beispielsweise mit Human-CD28 Analogen zu JJ319) oder Immunverstärkung (beispielsweise mit Human-CD28 Analogen zu JJ316).

15

20

25

30

Patentansprüche:

1. Humanverträgliche monoklonale Antikörper, welche für  
5 Human-CD28 spezifisch sind und Human-T-Lymphozyten  
mehrerer bis aller Untergruppen ohne Besetzung eines  
Antigenrezeptors der Human-T-Lymphozyten und somit an-  
tigenunspezifisch aktivieren.
- 10 2. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 1, die erhältlich  
sind durch .
  - A) Herstellung von zur Produktion von monoklonalen  
Human-CD28 spezifischen Tier-Antikörpern  
15 befähigten Hybridomzellen im Wege einer Immu-  
nisierung mit nicht-T-Tumorzelllinien, auf  
welchen Human-CD28 exprimiert ist,
  - B) ggf. Humanisierung der aus Hybridomzellen gemäß  
20 Stufe A erhältlichen monoklonalen Tier-  
Antikörper durch biochemischen oder gentech-  
nologischen Austausch konstanter Komponenten  
der Tierantikörper gegen analoge konstante Kom-  
ponenten eines menschlichen Antikörpers bzw.  
Austausch den Komponenten entsprechender Gene  
25 der Hybridomzellen,
  - C) Sezernierung der monoklonalen Antikörper in  
Hybridomzell-Kulturen und Isolierung der monok-  
lonalen Antikörper daraus oder Produktion der  
monoklonalen Antikörper durch Injektion der  
30 Hybridomzellen in Tiere, beispielsweise Mäuse,  
und Isolierung der monoklonalen Antikörper aus  
der Körperflüssigkeit der Tiere.

3. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 1 oder 2, wobei die zur Produktion von monoklonalen Human-CD28 spezifischen Tier-Antikörpern befähigten Hybridomzellen
- 5 erhältlich sind durch
- a) Schaffung eines Plasmids mittels Insertion von Human-CD28 cDNA in den pH3APr-1-neo Vector nach Excision des SalI-HindIII Fragments und Herstellung von Protoplasten aus Escherichia coli (MC1061), welche das Plasmid tragen,
  - 10 b) Fusionierung der Protoplasten mit Maus A20J und/oder L929 Tumorzellen mittels Polyethylenglykol,
  - c) Kultivierung der in Stufe b erhaltenen transfektierten Zellen,
  - 15 d) Screenen der transfektierten Maus A20J und/oder L929 Zellen auf die Expression von Human-CD28 und Selektion von Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen,
  - 20 e) Immunisierung von BALB/c Mäusen mit den Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen,
  - f) Entnahme von Milzzellen der so immunisierten Mäuse und Fusionierung der Milzzellen mit Zellen der Zelllinie X63-Ag 8.653 mittels Polyethylenglykol,
  - 25 g) Selektierung der so erhaltenen Hybridomzellen mit der Maßgabe, daß im Überstand selektierter Hybridomzellen Antikörper enthalten sind, die an Human-CD28 exprimierende Maus A20J und/oder
  - 30 h) Kultivierung/Subclonierung der in Stufe g erhaltenen selektierten Hybridomzellen.



- 4) Hybridomzellen zur Herstellung von monoklonalen Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 3, die durch folgende Verfahrensschritte erhältlich sind:
- a) Schaffung eines Plasmids mittels Insertion von Human-CD28 cDNA in den pH8APr-1-neo Vector nach Excision des SalI-HindIII Fragments und Herstellung von Protoplasten aus Escherichia coli (MC1061), welche das Plasmid tragen,
  - b) Fusionierung der Protoplasten mit Maus A20J und/oder L929 Tumorzellen mittels Polyethylenglykol,
  - c) Kultivierung der in Stufe b erhaltenen transfektierten Zellen,
  - d) Screenen der transfektierten Maus A20J und/oder L929 Zellen auf die Expression von Human-CD28 und Selektion von Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen,
  - e) Immunisierung von BALB/c Mäusen mit den Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen,
  - f) Entnahme von Milzzellen der so immunisierten Mäuse und Fusionierung der Milzzellen mit Zellen der Zelllinie X63-Ag 8.653 mittels Polyethylenglykol und
  - g) Selektierung der so erhaltenen Hybridomzellen mit der Maßgabe, daß im Überstand selektierter Hybridomzellen Antikörper enthalten sind, die an Human-CD28 exprimierende Maus A20J und/oder L929 binden.

- 5) Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern nach einem der Ansprüche 1 bis 3 mit folgenden.

Verfahrenstufen:

- 5           A) Herstellung von zur Produktion von monoklonalen Human-CD28 spezifischen Tier-Antikörpern befähigten Hybridomzellen im Wege einer Immunisierung mit nicht-T-Tumorzelllinien, auf welchen Human-CD28 exprimiert ist,
- 10           B) ggf. Humanisierung der aus Hybridomzellen gemäß Stufe A erhältlichen monoklonalen Tier-Antikörper durch biochemischen oder gentechnologischen Austausch konstanter Komponenten der Tierantikörper gegen analoge konstante Komponenten eines menschlichen Antikörpers bzw.
- 15           Austausch den Komponenten entsprechender Gene der Hybridomzellen,
- 20           C) Sezernierung der monoklonalen Antikörper in Hybridomzellen-Kulturen und Isolierung der monoklonalen Antikörper daraus oder Produktion der monoklonalen Antikörper durch Injektion der Hybridomzellen in Tiere, beispielsweise Mäuse, und Isolierung der monoklonalen Antikörper aus der Körperflüssigkeit der Tiere.

25

- 6) Verfahren nach Anspruch 5, wobei die zur Produktion von monoklonalen Human-CD28 spezifischen Tier-Antikörper befähigten Hybridomzellen in folgenden Verfahrensstufen hergestellt werden:

30

- a) Schaffung eines Plasmids mittels Insertion von Human-CD28 cDNA in den pHSAPr-1-neo Vector nach Excision des SalI-HindIII Fragments und

Herstellung von Protoplasten aus Escherichia coli (MC1061), welche das Plasmid tragen,

- b) Fusionierung der Protoplasten mit Maus A20J und/oder L929 Tumorzellen mittels Polyethylenglykol,
- c) Kultivierung der in Stufe b erhaltenen transfektierten Zellen,
- d) Screenen der transfektierten Maus A20J und/oder L929 Zellen auf die Expression von Human-CD28 und Selektion von Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen,
- e) Immunisierung von BALB/c Mäusen mit den Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen,
- f) Entnahme von Milzzellen der so immunisierten Mäuse und Fusionierung der Milzzellen mit Zellen der Zelllinie X63-Ag 8.653 mittels Polyethylenglykol und
- g) Selektierung der so erhaltenen Hybridomzellen mit der Maßgabe, daß im Überstand selektierter Hybridomzellen Antikörper enthalten sind, die an Human-CD28 exprimierende Maus A20J und/oder L929 Zellen binden.

7) Verwendung von monoklonalen Antikörpern nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung eines Arzneimittels zur therapeutischen Behandlung des menschlichen Körpers.



8) Verwendung nach Anspruch 7 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Erkrankungen mit

pathologisch erniedrigten CD4-T-Zellzahlen, insbesondere AIDS oder nach Stammzelltransplantation nach Chemotherapie von leukämischen Erkrankungen.

5

- 9) Verwendung nach Anspruch 7 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Potenzierung und/oder qualitativen Beeinflussung von Immunreaktionen bei Schutzimpfungen.

10

- 10) Verwendung nach Anspruch 7 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Beeinflussung der Qualität der T-Zellreaktion, insbesondere zur Beeinflussung der Produktion verschiedener Effektormoleküle, beispielsweise Zytokine, bei beispielsweise Autoimmunerkrankungen.

15



20

25

30

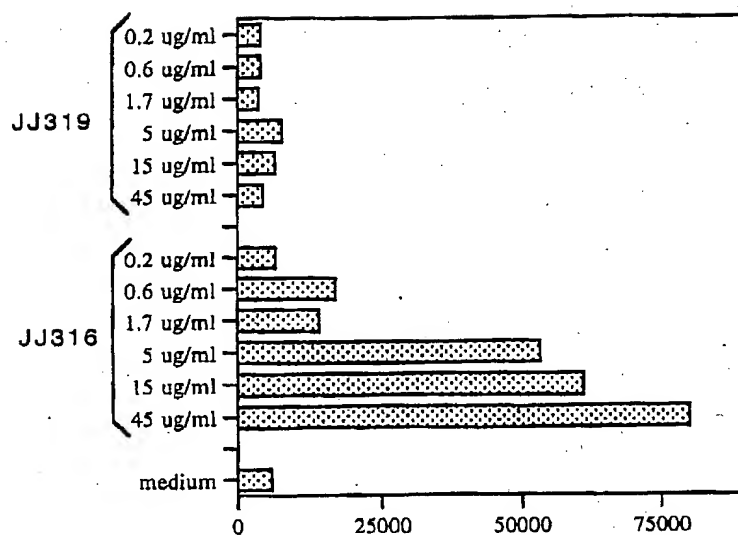
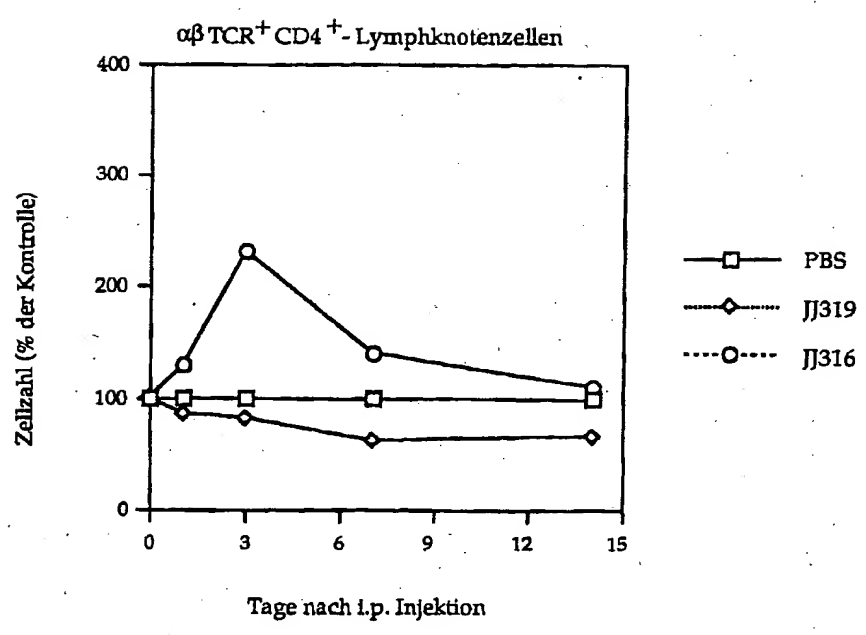
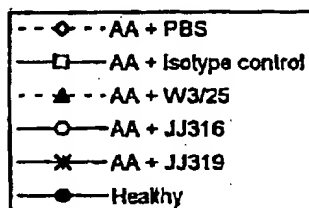
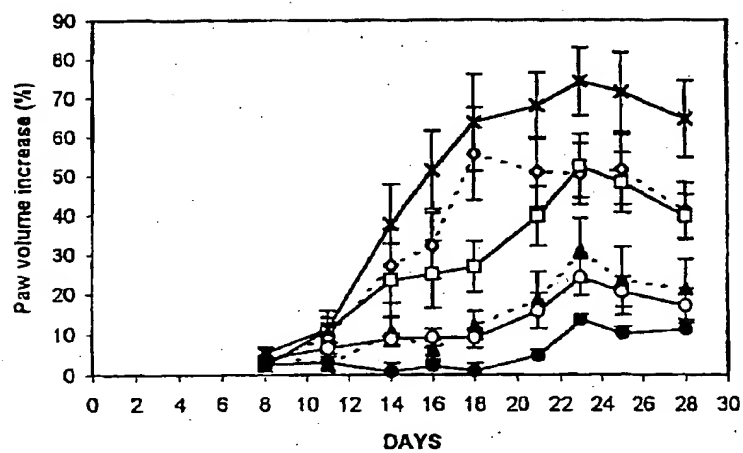


FIG. 1



**FIG. 2**



**FIG. 3**

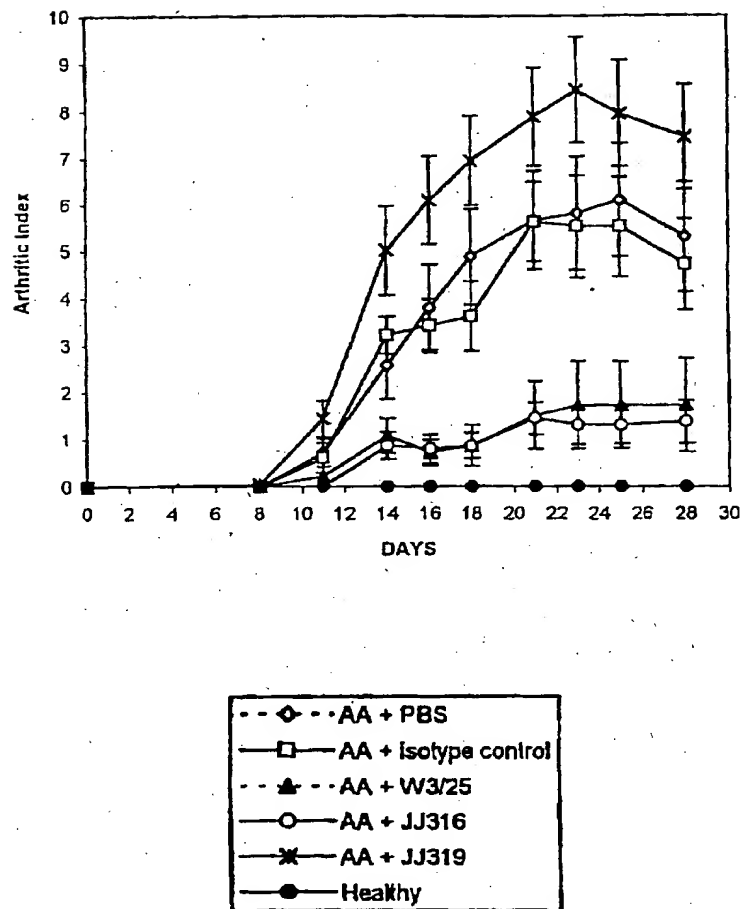


FIG. 4